Simplexa™ EBV

REF MOL2400
Rev. F



Ein Echtzeit-PCR-Assay zur quantitativen *In-vitro*-Bestimmung des Epstein-Barr-Virus (EBV).

***In-vitro*-Diagnostikum**

ANWENDUNGSBEREICH

Der Simplexa EBV-Assay von Focus Diagnostics dient der quantitativen *In-vitro*-Bestimmung der Nukleinsäuren des Epstein-Barr-Virus im Vollblut mit dem Integrated Cycler von 3M.

Die klinische Behandlung der mit EBV infizierten Patienten stützt sich auf diesen Assay im Kontext mit der Klinik des Patienten sowie weiteren Laborparametern des Krankheitsverlaufes.

Der Assay ist nicht zum Screening von Spendern vorgesehen.

ZUSAMMENFASSUNG UND ERLÄUTERUNG

Das Epstein-Barr-Virus (EBV), ein ubiquitärer B-lymphtroper Herpesvirus, ist ursächlich für die infektiöse Mononukleose verantwortlich und steht in engem Zusammenhang mit verschiedenen Malignomen des Menschen. Infektionen mit dem EBV sind häufig und verlaufen meist blande bzw. in Form einer selbstlimitierenden Erkrankung von zwei bis drei Wochen Dauer. Als Mitglied der Herpesfamilie kann das EBV über lange Zeiträume schlummern, um zu einem späteren Zeitpunkt reaktiviert zu werden. Die Erstinfektion kann als relativ benignes Syndrom verlaufen, während bei einem immunkompromittierten Patienten die Reaktivierung durchaus zu schwereren Folgen führen kann. EBV-Nukleinsäuren und -Proteine wurden im Gewebe bei folgenden Erkrankungen nachgewiesen: Burkitt-Lymphom[1], M. Hodgkin[2-4], Karzinome des Nasenrachenraumes[1, 5], Transplantations-bedingte lymphoproliferative Erkrankungen[6-8], AIDS-bedingtes primäres Lymphom des zentralen Nervensystems[9, 10] sowie weitere B- und T-Zelllymphome[11, 12].

Die Abklärung EBV-bedingter Erkrankungen mittels konventioneller Diagnostik bei immunsupprimierten Patienten ist nur in den seltensten Fällen erfolgreich. Für klinische Zwecke sind Kulturen weder praktisch noch sinnvoll und die Serologie ist im Kontext der Immunsuppression schwierig einzuordnen.[13] Diagnostikverfahren auf der Grundlage der Polymerasekettenreaktion (PCR) bieten die Möglichkeit des zweckdienlichen EBV-Nachweises aus Blutproben. Die Kontrolle der Viruslast kann dazu beitragen lymphoproliferative Erkrankungen nach einer Transplantation aufzudecken und Patienten mit AIDS auf Lymphome zu kontrollieren[14-15].

GRUNDLAGEN DES VERFAHRENS

Bei dem Test handelt es sich um ein Echtzeit-PCR-System zur Amplifikation und Detektion. Der DNA-Nachweis des Epstein-Barr-Virus im Vollblut erfolgt durch eine bifunktionelle fluoreszierende Primersonde. Der Test besteht im Wesentlichen aus zwei Schritten: (1) Extraktion von DNA aus Patientenproben, (2) Amplifizierung eines spezifischen Zielmoleküls (in jedem Analyt und der internen Kontrolle) mithilfe eines bifunktionellen fluoreszierenden Sondenprimers und eines Rückwärts-Primers. Der Assay liefert eine Zahl als Ergebnis; die virale DNA in der Probe wird über eine gut konservierte Zielregion im Lmp2A-Gen des EBV-Genoms identifiziert. Zur Überprüfung der Extraktion und zur Erkennung einer Hemmung der PCR wird eine interne Kontrolle mitgeführt. Das aus jeder Probe gewonnene Amplifizierungssignal wird mit einer Kalibrierkurve verglichen und quantifiziert.

MITGELIEFERTES MATERIAL

Das Simplexa™ EBV-Kit von Focus Diagnostics enthält ausreichend Reagenzien für 100 Bestimmungen.

Beschreibung der Komponente

Bezeichnung der Komponente	REF	EC-ZEICHEN AUF ETIKETT		Kurzbezeichnung	Deckelfarbe	Anzahl Fläschchen	Reaktionen pro Gefäß /Kit	Volumen pro Fläschchen
Simplexa™ EBV Primer Mix	**MOL2401**	**REAG**	**A**	**PM**	Braun	2	50/100	50 µL
Simplexa™ Master Mix	**MOL2000**	**REAG**	**B**	**MM**	Grün	2	50/100	200 µL
Simplexa Extraction & Amplification Control DNA	**MOL9001**	**CONTROL**	**IC**	**IC**	Blau	3	50/150	250 µL
Simplexa™ EBV Low Positive Control	**MOL2402**	**CONTROL**	**+**	**LPC**	Weiß	6	1/6	200 µL
Simplexa™ EBV High Positive Control	**MOL2403**	**CONTROL**	**++**	**HPC**	Rot	6	1/6	200 µL

Beschreibung der Komponente

<table>
<tr><th>Komponente</th><th>Beschreibung</th></tr>
<tr><td>Simplexa™ EBV Primer Mix (PM) (Primer-Mix)</td><td>Mit fluoreszierendem Farbstoff markierte Primer, die EBV und die Interne DNA-Kontrolle spezifisch quantifizieren.
<table>
<tr><th>Target</th><th>Sonden-Fluorophor (Farbstoff)</th><th>Exzitation</th><th>Emission</th><th>Zielgen</th></tr>
<tr><td>EBV</td><td>FAM</td><td>495 nm</td><td>520 nm</td><td>Lmp2A-Gen</td></tr>
<tr><td>Interne Kontrolle</td><td>Q670</td><td>644 nm</td><td>670 nm</td><td>A. thaliana-Gen</td></tr>
</table></td></tr>
<tr><td>Simplexa™ Master Mix (MM) (Master-Mix)</td><td>DNA-Polymerase, Puffer und dNTPs</td></tr>
<tr><td>Simplexa™ Extraction & Amplification Control DNA (IC) (DNA für die Extraktions- und Amplifikationskontrolle)</td><td>Ein 577 Basenpaare umfassendes DNA-Fragment aus dem Gen, das die N-Methyltransferase der großen Untereinheit der Ribulose-1,5-biphosphat-Carboxylase/Oxygenase der Pflanze Arabidopsis thaliana kodiert.</td></tr>
<tr><td>Simplexa™ EBV Positive Control (LPC) (Niedrigpositiv-Kontrolle)</td><td>Inaktiviertes EBV in humaner Basismatrix.</td></tr>
<tr><td>Simplexa™ EBV High Positive Control (HPC) (Hochpositiv-Kontrolle)</td><td>Inaktiviertes EBV in humaner Basismatrix.</td></tr>
<tr><td>Simplexa™ EBV Barcode Card (Barcode-Karte)</td><td>Test-spezifische Parameter</td></tr>
</table>

ERFORDERLICHES, JEDOCH NICHT MITGELIEFERTES MATERIAL

1. Simplexa™ EBV Quantitation Standards REF MOL2410
2. 3M Integrated Cycler mit Integrated Cycler Studio-Software, Version 3.0 oder höher
3. Universal Discs zur Verwendung auf dem Integrated Cycler
4. Universal Disc-Abdeckfolie
5. [a] Roche MagNA Pure LC und zugehöriges Verbrauchsmaterial
6. [a] Roche MagNA Pure LC Total Nucleic Acid Isolation Kit (Roche Kat.-Nr. 03038505001)
7. [b] NucliSENS® easyMAG™ Gerät von bioMérieux und dazugehörige(s) Verbrauchsmaterial und Reagenzien
8. [b] Biohit/bioMérieux Mehrkanalpipette
9. [b] ELISA-Teststreifenplatte
10. Ein-, Mehrkanalmikropipette(n) und/oder Repetiermikropipette(n) mit einem Genauigkeitsbereich von 1-10 µl, 10-100 µl und 100-1000 µl
11. Gefrierschrank, -10 °C bis -30 °C (mit manueller Abtaufunktion), für die Lagerung der gefrorenen Kit-Komponenten
12. Kühlschrank mit 2 °C bis 8 °C (für Proben und aufgetaute Kit-Komponenten)
13. Biologische Sicherheitswerkbank (Laminarflow-Haube) für die Durchführung der Extraktionen
14. Mikrozentrifuge
15. Vortex-Mischer
16. Sterile, RNase/DNase-freie Einmalpipettenspitzen mit Aerosolbarriere
17. 1,5 ml Polypropylen-Mikrozentrifugenröhrchen und Ständer (RNase-/DNase-freie Röhrchen werden empfohlen, sind aber nicht vorgeschrieben)
18. Einweg-Schutzhandschuhe (ungepudert)
19. Nukleasefreies Wasser (zur Extraktion und als Leerwert-Kontrolle (NTC, No-Template Control))
20. Kühlständer für 1,5 ml Mikrozentrifugenröhrchen

[a] Zur Verwendung beim Roche MagNA Pure LC-Extraktionsverfahren
[b] Zur Verwendung beim bioMerieux easyMAG Extraktionsverfahren

HALTBARKEIT UND HANDHABUNG

1. Reagenzien bei -10 bis -30 °C aufbewahren (keine Gefriergeräte mit Abtauautomatik verwenden).
2. Reagenzien vor Gebrauch bei Raumtemperatur auftauen lassen (Temperaturbereich ca. 18 °C bis 25 °C).
3. Kits und Reagenzien nach Ablauf des Verfallsdatums nicht mehr verwenden.
4. Das Reaktionsgemisch nach Zugabe des Master-Mix innerhalb einer Stunde verwenden. Das Reaktionsgemisch bei 2 °C bis 8 °C lagern, bis die PCR angesetzt werden kann.
5. Nach dem ersten Auftauen können Primer-Mix, Master-Mix und DNA für die Extraktions- und Amplifikationskontrolle maximal 30 Tage bei 2–8 °C aufbewahrt werden.
6. Primer-Mix, Master-Mix, Positivkontrollen und DNA für die Extraktions- und Amplifikationskontrolle nicht wieder einfrieren.
7. Keine Reagenzien aus verschiedenen Kitchargen kombinieren.

WARNHINWEISE UND VORSICHTSMASSNAHMEN

1. *In-vitro*-Diagnostikum
2. Alle Humanmaterialien sollten als potenziell infektiös angesehen werden. Das Ursprungsmaterial dieses Produktes (einschließlich der Kontrollen) ist mit US-FDA-anerkannten Methoden auf HBs-Antigen, Hepatitis C-Antikörper und HIV-1/2 (AIDS) Antikörper untersucht und für negativ befunden worden. Dennoch gewährleistet keine der bekannten Testmethoden absolute Garantie dafür, dass Produkte, die aus menschlichem Blut gewonnen wurden, die genannten oder andere infektiöse

Krankheiten nicht übertragen können. Alle Kontrollen, Serumproben und Geräte, die in Kontakt mit den Proben kommen, sollten daher als potenziell infektiös angesehen und durch entsprechende biologische Sicherheitsmaßnahmen dekontaminiert oder entsorgt werden. CDC und NIH empfehlen, dass möglicherweise infektiöse Substanzen entsprechend Biosicherheitsstufe 2 gehandhabt werden.[16, 17]

3. Beim Umgang mit den Kit-Reagenzien persönliche Schutzausrüstung wie (jedoch nicht beschränkt auf) Handschuhe und Laborkittel tragen. Hände nach der Durchführung des Tests gründlich waschen.
4. Nicht mit dem Mund pipettieren.
5. In Bereichen, in denen Kit-Reagenzien und/oder Humanproben gehandhabt werden, darf nicht geraucht, getrunken und gegessen werden. In diesen Bereichen sollten auch keine Kontaktlinsen eingesetzt/herausgenommen und kein Make-up aufgetragen werden.
6. Nicht verwendete Kit-Reagenzien bzw. Humanproben gemäß den örtlichen und nationalen Bestimmungen entsorgen.
7. Der Arbeitsablauf im Labor sollte nur in einer Richtung erfolgen: ausgehend vom/von den Prä-Amplifikationsbereich(en) in Richtung Amplifikations-/Detektionsbereich: Im folgenden Abschnitt wird der Ablauf der Arbeitsschritte von der Probenextraktion bis zur Amplifizierung mittels Echtzeit-PCR beschrieben:
   - Am Anfang steht die Probenextraktion, gefolgt von der Einstellung des Geräts zur Durchführung der Echtzeit-PCR, der Zubereitung der Reagenzien und schließlich der Amplifizierung mittels Echtzeit-PCR.
   - Die Verbrauchsmaterialien und Instrumente dürfen nicht bereichsübergreifend zwischen den speziellen Probenextraktions- und Probenvorbereitungsbereichen verwendet werden. Sie sollten auch nicht zwischen den verschiedenen Bereichen ausgetauscht werden.
   - Verbrauchsmaterial und technische Ausstattung für die Probenvorbereitung dürfen nicht für die Reagenzienzubereitung oder zum Bearbeiten amplifizierter DNA oder anderer Quellen der Zielnukleinsäure verwendet werden.
   - Sämtliches Verbrauchsmaterial und sämtliche technischen Vorrichtungen für die Amplifikation müssen immer im Bereich des Echtzeit-PCR-Geräts verbleiben.
   - Auch die persönliche Schutzausrüstung, wie z B. Laborkittel und Einmalhandschuhe, sollten bereichsspezifisch gehandhabt werden.
8. Die Kontamination von Reagenzien bzw. Patientenproben kann zu einer Verfälschung der Testergebnisse führen. Unter aseptischen Bedingungen arbeiten.
9. Die Reagenzien vorsichtig pipettieren und handhaben, um eine Kontamination mit Material aus benachbarten Kavitäten zu verhindern.
10. Geeignete Pipettiertechniken anwenden und für die Dauer des Tests das gleiche Pipettierschema einhalten, um optimale und reproduzierbare Werte zu erhalten.
11. Die Reagenzien nicht gegen Reagenzien anderer Kit-Chargen oder anderer Hersteller austauschen oder mit diesen mischen.
12. Die Verschlusskappen der Reagenzröhrchen nicht vertauschen. Dies könnte zur Kontamination führen und die Testergebnisse beeinträchtigen.
13. Nur das in diesem Beipackzettel beschriebene Protokoll verwenden. Bei Nichteinhaltung des Protokolls oder der angegebenen Zeiten sowie Temperaturen kann es zu fehlerhaften Testergebnissen kommen.
14. Der Testansatz sollte bei Raumtemperatur (Temperaturbereich ca. 18 °C bis 25 °C) erfolgen. Beim Mischen der Reagenzien die Enzyme durch einen Kühlblock gekühlt halten.
15. Universal Discs, die bereits in Kontakt mit Patientenproben oder Reagenzien gekommen sind, nicht wieder verwenden.
16. Gebrauchte Discs ohne Abnehmen der Abdeckfolie entsorgen.
17. Wenn verschiedene Simplexa™ Kits auf der gleichen Disc angesetzt werden, müssen die Positiv- und Leerwert-Kontrollen aus jedem verwendeten Kit getestet werden.
18. Der Master-Mix enthält >1% Glycerin, welches bei Einatmen oder Hautkontakt zu Reizungen führen kann. Nach Einatmen oder Berührung sollten Erste-Hilfe-Maßnahmen eingeleitet werden.
19. Eine längere Aufbewahrung extrahierter Proben bei 2 °C bis 8 °C wird nicht empfohlen; die Leistung wurde unter diesen Bedingungen nicht geprüft.
20. Das Kit bei offensichtlich angebrochener oder beschädigter Verpackung bzw. angebrochenem oder beschädigtem Inhalt nicht verwenden und Focus Diagnostics kontaktieren. Kontaktadressen befinden sich auf der letzten Seite dieses Dokuments.

GEBRAUCHSANWEISUNG

A. PROBENGEWINNUNG

Als Probe kommt durch Venenpunktion gewonnenes Vollblut zum Einsatz. Keine Probenröhrchen mit Heparin als Antikoagulans verwenden. Heparin inhibiert die PCR.

B. PROBENEXTRAKTIONSBEREICH

In einem speziellen, der Extraktion von Proben und Kontrollen vorbehaltenen Bereich arbeiten. Die Vorbereitung der Proben für die Extraktion wird auf einer biologischen Sicherheitswerkbank durchgeführt.

Extraktion mit dem MagNA Pure LC-Extraktionsverfahren von Roche

1. Die Extraktion von Nukleinsäuren aus Patientenproben und Assaykontrollen erfolgt mit dem Roche MagNA Pure Total Nucleic Acid-Kit und dem Roche MagNA Pure LC Automated Nucleic Acid Extractor-Gerät. Hinsichtlich der Nukleinsäureextraktion mit diesem Kit die Gebrauchsanweisungen des Herstellers beachten.
2. Im Dropdownmenü „Protocol“ des MagNA Pure LC-Systems die Optionen „Total NA“ und anschließend „Total NA Variable_elution_volume.blk“ wählen. Damit werden die passenden Einstellungen für den Lauf geladen.
3. Das Probenprotokoll sollte „Total NA Variable_elution_volume“ sein.

4. Als Probenvolumen sollte 200 µl und als Elutionsvolumen 50 µl eingestellt sein.
5. Das Verdünnungsvolumen sollte für alle Proben auf Null eingestellt sein.
6. Das „Post Elution Protocol“ muss auf „None“ eingestellt sein.
7. Darauf achten, dass Proben und Kontrollen sich auf der Probenkartusche an der richtigen Position befinden.
8. Jede Probe, Niedrigpositiv- und Hochpositiv-Kontrolle 2-4 Sekunden vortexen und kurz zentrifugieren, um die Inhaltsstoffe auf den Boden des Röhrchens zu ziehen.
9. 200 µl von jeder Probe, Niedrig- und Hochpositiv-Kontrolle sowie Leerwert-Kontrolle in die entsprechende Position auf der Probenkartusche pipettieren.
10. Den Füllpegel der Proben und Kontrollen in der Probenkartusche einer Sichtprüfung unterziehen, um sicherzustellen, dass Probe(n) zugegeben wurde(n).
11. Die DNA zur Extraktions- und Amplifikationskontrolle zweimal pulsvortexen und kurz zentrifugieren, um die Inhaltsstoffe auf den Boden des Röhrchens zu ziehen.
12. Für je 16 Proben (1-16 Proben) 100 µl der (IC) in 6 ml Lysepuffer in ein konisches Röhrchen pipettieren. Kurz auf dem Vortex mischen. In das entsprechende Fach des MagNA Pure Extraktionsgerätes geben.
    - Werden beispielsweise mehr als 16 Proben (17-32 Proben) extrahiert, müssen 200 µl der IC in 12 ml Lysepufferlösung in ein konisches Röhrchen pipettiert werden. Kurz auf dem Vortex mischen. In das entsprechende Fach des MagNA Pure Extraktionsgerätes geben.
13. Die Probenkartusche in das MagNA Pure LC Automated Nucleic Acid-Extraktionsgerät überführen und die Extraktion starten.
14. Nach Abschluss der Nukleinsäureextraktion kann die Kartusche mit den extrahierten Kontrollen und Patientenproben aus dem MagNA Pure-Extraktor herausgenommen und verschlossen werden. Die extrahierte DNA vor der Verwendung bei 2 °C bis 8 °C aufbewahren. Die Langzeitaufbewahrung extrahierter Proben bei dieser Temperatur wird nicht empfohlen. Extrahierte DNA-Proben beim Laden der Disc auf einem Kühlblock aufbewahren.

Extraktion mit dem NucliSENS® easyMAG™-Extraktionsverfahren von bioMérieux

1. Zur Bedienung von Gerät und Software ist das Benutzerhandbuch des NucliSENS® easyMAG™ zu beachten.
2. In der NucliSENS® easyMAG™ Software die Vorlage „Generic“ [Allgemein] mit folgenden Einstellungen wählen:

Default Request [Standardanfrage]:	Generic 2.0.1 (oder äquivalent)
Run Name Prefix [Anfangskode der Laufbezeichnung]:	(beliebig)
Sample ID prefix [Anfangskode der Proben-ID]:	(beliebig)
Sample Type [Probentyp]:	Primary [Primär]
Workflow Defaults [Standardarbeitsabläufe]:	On-board lysis Incubation [Lyse-Inkubation im Gerät] On-board Silica Incubation [Inkubation mit Silica im Gerät] Sample Addition Guidance Off [Hinweise zur Zugabe von Proben Aus)
Reagent Tracking [Rückverfolgung der Reagenzien]:	Lysis, Silica, Internal Control reagent tracking disabled [Rückverfolgung von Lyse-Reagenz, Silica und interner Kontrolle deaktiviert)

3. Die individuellen Probendaten in der Bildschirmmaske „Extraction Request“ [Extraktionsanforderung] wie folgt eingeben:

Sample ID [Proben-ID]:	(Probenbezeichnung eingeben)
Request [Anfrage]:	Generic 2.0.1 (oder äquivalent)
Volume [Volumen] (ml):	0,100
Eluate [Eluat] (µl):	25
Type [Typ]:	Primary [Primär]
Priority [Priorität]:	Normal
Matrix:	Other [Andere]

4. Nach den Angaben im Benutzerhandbuch in der NucliSENS® easyMAG™ Software einen „Extraction Run“ [Extraktionslauf] erstellen.
5. Jede Probe, Niedrigpositiv- und Hochpositiv-Kontrolle 2-4 Sekunden vortexen und kurz zentrifugieren, um die Inhaltsstoffe auf den Boden des Röhrchens zu ziehen.
6. 100 µl der Probe, der Niedrig-/Hochpositiv- und der Leerwert-Kontrolle in das (die) Probengefäß(e) pipettieren.
7. Die Interne Kontrolle zweimal (2x) pulsvortexen und kurz zentrifugieren, um die Inhaltsstoffe auf den Boden des Röhrchens zu ziehen.
8. In jede Proben- und alle Kontroll-Kavitäten 5 µl Interne Kontrolle pipettieren. Zwischen den Proben die Pipettenspitze wechseln.
9. Nach den Angaben im Benutzerhandbuch das/die Probengefäß(e), neue Verbrauchsmaterialien für den Aspirator und die Reagenzien in das easyMAG™ Gerät laden.
10. Die Lyse im Gerät starten und die lysierten Proben 10 Minuten inkubieren, bevor das magnetische Silica-Gemisch zugegeben wird.

11. Das magnetische Silica-Gemisch während der Lyse-Inkubation vorbereiten. Silica mischen und mit nukleasefreiem Wasser verdünnen, indem 1 Teil magnetisches Silica zu 1 Teil nukleasefreiem Wasser gegeben wird (z. B. 540 µl magnetisches Silica + 540 µl nukleasefreies Wasser). Je Probe mindestens 135 µl magnetisches Silica-Gemisch vorbereiten.
12. Zum Übertragen des Silica-Gemisches in die Kavitäten der ELISA-Teststreifen das magnetische Silica-Gemisch anmischen und 1 Spitze sowie den Betriebsmodus P2 der Biohit-Pipette verwenden. Auf **Start** drücken, um 1050 µl des magnetischen Silica-Gemisches anzusaugen, und nochmals auf **Start** drücken, um das erste Volumen zurück in das Röhrchen mit Silica-Gemisch auszuwerfen. Auf **Start** drücken, um 125 µl des magnetischen Silica-Gemisches in 8 einzelne Kavitäten des ELISA-Teststreifens zu pipettieren. Bedarfsweise für weitere ELISA-Teststreifen wiederholen.
13. Nach der 10-minütigen Lyseinkubation 8 Spitzen (je ELISA-Teststreifen) und den Betriebsmodus P3 der Biohit-Pipette verwenden, um jeder Probe in dem Probengefäß 100 µl des magnetischen Silica-Gemisches zuzusetzen. Die Spitzen in die Kavitäten der ELISA-Teststreifen geben und **Start** drücken, um das magnetische Silica-Gemisch zu mischen und anzusaugen.
14. Das magnetische Silica-Gemisch in das jeweilige Probengefäß geben und die Pipettenspitze(n) in die Proben eintauchen. Sie sollten sich unterhalb des Flüssigkeitsspiegels befinden. Auf **Start** drücken, um das magnetische Silica anzusaugen, zu pipettieren und mit den Proben zu mischen (3x). Die Pipettenspitzen müssen unterhalb des Flüssigkeitsspiegels bleiben, damit der Mischvorgang korrekt ausgeführt wird.
15. Für jedes weitere Probengefäß Schritt 13 und 14 wiederholen.
16. Nach Zugabe des magnetischen Silica-Gemisches zu allen Probengefäßen den Extraktionslauf starten.
17. Nach Abschluss des Laufs das (die) Probengefäß(e) aus dem Gerät nehmen. Werden die Proben nicht sofort weiterverarbeitet, sind sie in individuelle Röhrchen zu überführen, um das Risiko, dass magnetisches Silica zurück in die Probe fällt, zu minimieren. Die extrahierte DNA bis zum Gebrauch bei 2 °C bis 8 °C aufbewahren. Die Langzeitlagerung extrahierter Proben bei dieser Temperatur wird nicht empfohlen. Extrahierte DNA-Proben beim Beschicken der Disc auf einem Kühlblock aufbewahren.

C. EINSTELLUNG DES GERÄTS FÜR DIE ECHTZEIT-PCR

1. Einzelheiten darüber, wie die Integrated Cycler Studio Software zu konfigurieren ist, um eine Assaydefinition hinzuzufügen, einen Lauf einzustellen und die Läufe auf dem Integrated Cycler zu analysieren, sind der Bedienungsanleitung des Integrated Cycler zu entnehmen.

Hinweis: Vor Durchführung eines Vorhersagelaufes muss eine valide Standardkurve (Kalibrierungslauf) eingerichtet werden.

D. REAGENZIENZUBEREITUNGSBEREICH

Ein für die Vorbereitung des Reaktionsgemischs für den Simplexa™ EBV-Assay reservierter Bereich.

1. Primer-Mix und Master-Mix bei Raumtemperatur (etwa 18 °C bis 25 °C) auftauen. Jedes Röhrchen im Kit enthält eine für 50 Reaktionen ausreichende Reagenzienmenge. Vor jedem Gebrauch die Primer-Mix- und Master-Mix-Komponenten durch sechs- bis achtmaliges vorsichtiges Umdrehen durchmischen und dann kurz zentrifugieren, um die Inhaltsstoffe auf den Boden des Röhrchens zu ziehen.
2. In ein Polypropylen-Mikrozentrifugenröhrchen entsprechender Größe jede Komponente in dem in der folgenden Tabelle angegebenen Volumen pipettieren, um das erforderliche Volumen des Reaktionsgemisches zuzubereiten.

Reaktionsgemischvolumen

Reagens	Reaktionsgemisch-Volumen / 1 Reaktion	Reaktionsgemisch-Volumen / 10 Reaktionen
Simplexa™ Master Mix	4,0 µl	40 µl
Simplexa™ EBV Primer Mix	1,0 µl	10 µl
Gesamtvolumen	5,0 µl	50 µl

3. Das Reaktionsgemisch durch Umdrehen des Röhrchens oder durch 8- bis 10-maliges Pipettieren vorsichtig mischen.
4. Kurz zentrifugieren, um die Inhaltsstoffe auf den Boden des Röhrchens zu ziehen.
5. Mit der Vorbereitung der PCR fortfahren.
6. Das Reaktionsgemisch innerhalb einer Stunde nach Zubereitung verwenden. Sofern die PCR-Vorbereitung nicht sofort nach dem Ansetzen des Reaktionsgemisches erfolgt, sollte dieses bei 2 °C bis 8 °C gelagert werden.

E. BEREICH FÜR DIE ECHTZEIT-PCR-AMPLIFIKATION

In einem speziellen, der Vorbereitung der Universal Disc mit 96 Kavitäten für den Simplexa™ EBV-Assay vorbehaltenen Bereich arbeiten.

Bei der Durchführung folgender Vorbereitungsschritte das beispielhafte Disc-Layout in Abschnitt C beachten:

1. In jede Kavität 5,0 µl des Reaktionsgemischs pipettieren.
2. 5,0 µl der extrahierten Positivkontrollen in die Kavität "HPC und LPC" pipettieren.
3. 5,0 µl der extrahierten Patientenprobe in die entsprechende Kavität "S" pipettieren.
4. 5,0 µl der extrahierten Leerwert-Kontrolle in die Kavität "NTC" pipettieren.
5. Die Disc mit dem Universal Disc Cover Tape abdecken.
6. Den Deckel des Integrated Cycler öffnen.
7. Die verschlossene Universal Disc auf die Platte legen.
8. Den Deckel vorsichtig schließen.
9. Auf **Run [Lauf)** klicken.
10. Auf **Start** klicken.

F. DATENANALYSE

1. Nach Beendigung des Laufs auf Analyze [Analysieren] klicken.
2. Die **Farbstoffe** einzeln prüfen oder durch Anklicken des Markierungsfeldes neben jedem Farbstoff alle Farbstoffe (Kanäle) auswählen.
3. Durch Anklicken von **Print Preview [Druckvorschau]** (unten rechts) wird eine Zusammenfassung der prädiktiven Werte ausgegeben. Zur Vorschau der Amplifikationskurven das Häkchen im Markierungsfeld **Include Graphs [Mit Kurven]** setzen. Durch Setzen des Häkchens im Markierungsfeld **Include Calibration Result [Mit Kalibrierungsergebnis]** wird dem Vorhersagelauf der Kalibrierungsbericht hinzugefügt. Die Seiten mithilfe der Pfeiltasten links oben im Fenster **Print Preview [Druckvorschau]** durchblättern.
4. Den Bericht nach Bedarf Print [Ausdrucken] oder Save [Abspeichern].
5. Die prädiktiven Werte ggf. exportieren.

QUALITÄTSKONTROLLE

Jedes Labor sollte, ausgehend von den vor Ort geltenden Gesetzen, Bestimmungen und der üblichen guten Laborpraxis eigene Qualitätskontrollbereiche wie auch die Häufigkeit der Qualitätskontrollen ermitteln.

ERSTELLUNG VON ERGEBNISBERICHTEN

1. Laufvalidität

   Durch Überprüfung der EBV- und IC-Ergebnisse für die Niedrigpositiv-Kontrolle (LPC), Hochpositiv-Kontrolle (HPC) und Leerwert-Kontrolle die Validität des Laufs ermitteln. Damit der Lauf als valide gilt, müssen alle drei Kontrollen die Akzeptanzkriterien erfüllen. Bei ungültigem Lauf müssen alle Patientenproben erneut getestet werden.

Akzeptanzkriterien

Kontrolle	EBV	DNA für die Extraktions- und Amplifikationskontrolle (IC)
No-Template Control (NTC)	Nicht detektiert	Detektiert
Low Positive Control (LPC)	Innerhalb des Toleranzwertes auf dem chargenspezifischen Etikett	nicht zutreffend
High Positive Control (HPC)	Innerhalb des Toleranzwertes auf dem chargenspezifischen Etikett	nicht zutreffend

- Der Leerwert (NTC) entspricht den Akzeptanzkriterien, falls kein EBV detektiert und die Interne Kontrolle (IC) nachgewiesen wurde. Die Detektion von EBV in der Leerwert-Kontrolle zeigt an, dass die Proben möglicherweise während der Verarbeitung kontaminiert wurden.
- Die Niedrigpositiv-Kontrolle (LPC) erfüllt die Akzeptanzkriterien, falls die in der LPC detektierte EBV-Konzentration innerhalb der Toleranzgrenzen (wie auf dem chargenspezifischen Etikett angegeben) liegt und die IC zwar hätte nachgewiesen werden sollen, dies aber nicht zwingend erforderlich war.
- Die Hochpositiv-Kontrolle (HPC) erfüllt die Akzeptanzkriterien, falls die in der HPC detektierte EBV-Konzentration innerhalb der Toleranzgrenzen (wie auf dem chargenspezifischen Etikett angegeben) liegt und die IC zwar hätte nachgewiesen werden sollen, dies aber nicht zwingend erforderlich war.

2. Interpretation der Ergebnisse

Interpretation der Ergebnisse

Beispiel	EBV-Wert	IC-Wert*	Interpretation
1	Nicht detektiert	Detektiert	EBV nicht detektiert
2	< 900 Kopien/ml	n. z.	EBV detektiert, unterhalb LLoQ (Lower Limit of Quantitation)
3	X Kopien/ml	n. z.	EBV-Nachweis bei bestimmter Konzentration
4	> 8,07 x 10^8 Kopien/ml	n. z.	EBV detektiert, oberhalb ULoQ (Upper Limit of Quantitation)
5	Nicht detektiert	Nicht detektiert	Ungültig, erneut extrahieren und Test wiederholen

3. Validität der Probenergebnisse

   Eine Probe ist valide, falls entweder

   1. kein EBV detektiert und die IC nachgewiesen wurde oder
   2. EBV detektiert wurde. Für EBV-positive Ergebnisse muss die Interne Kontrolle nicht unbedingt nachgewiesen werden.
   3. Die Amplifizierungsdiagramme aller Ergebnisse sind zu überprüfen, inbesondere wenn eine “Data Quality”-Meldung [Datenqualität] vorliegt. Eine gültige Amplifizierungskurve zeigt einen glatten exponentiellen Anstieg. Weitere Einzelheiten dazu finden sich im Benutzerhandbuch.



EINSCHRÄNKUNGEN

1. Die Personen, die die Analyse durchführen, sollten sich vor Durchführung des Assays eingehend mit den Testverfahren und der Ergebnisinterpretation vertraut gemacht haben.
2. Zur Quantifizierung unbekannter Patientenproben speichert die 3M Integrated Cycler Studio-Software die letzte gültige Kalibrierungsdatei. Die Quantifizierungsstandards und Patientenproben müssen mit der identischen Methodik extrahiert werden, da es ansonsten zu fehlerhaften Testergebnissen kommen kann.
3. Bei der Überwachung eines Patienten **muss** das für die Erstbestimmung der Probe verwendete Extraktionsverfahren für alle weiteren Bestimmungen verwendet werden.
4. Alle Testergebnisse aus diesen und anderen Tests müssen im Zusammenhag mit der klinischen Anamnese, den epidemiologischen Daten und allen anderen Daten, die dem zuständigen Arzt vorliegen, gesehen werden.
5. Die Prävalenz der Infektion beeinflusst den prädiktiven Wert des Assays.
6. Wie bei anderen Tests auch, schließt ein negatives Ergebnis eine EBV-Infektion nicht aus.
7. Falls der die Infektion verursachende Organismus Genmutationen, Insertionen, Deletionen oder Rearrangements aufweist oder wenn die Testung im Frühstadium der Erkrankung erfolgt, kann es zu falsch negativen Ergebnissen kommen.
8. Falsch negative Ergebnisse können auftreten, wenn in der Probe aufgrund von Fehlern bei Entnahme, Transport oder Verarbeitung zu wenig Erreger vorhanden sind.
9. Wie bei anderen Testverfahren kann es auch hier zu falsch positiven Ergebnissen kommen. Eine Wiederholung des Tests oder die Durchführung des Tests mit einem anderen Gerät könnte in manchen Fällen indiziert sein.
10. Es liegt für diesen Assay kein Leistungsnachweis zum Screening von Spendern vor.
11. Die Leistungsfähigkeit dieses Assays bei Gabe von Medikamenten zur Behandlung der infektiösen Mononukleose, mit denen sich potenzielle Wechselwirkungen ergeben können, ist nicht bekannt.
12. Dieser Assay kann keine Erkrankung ausschließen, die durch andere bakterielle oder virale Erreger verursacht wird.

SPEZIFISCHE LEISTUNGSDATEN

METHODENVERGLEICH

An der Studie zur klinischen Übereinstimmung nahm eine (1) interne Prüfstelle teil. Die Referenzwerte wurden mit Hilfe eines im Labor entwickelten Hochleistungstests (LDT, Laboratory Developed Test) erstellt. Aus prospektiv entnommenen Proben, welche die Entnahmestelle zur EBV-Detektion bzw. –Quantifizierung entgegennahm, wurden insgesamt 56 Vollblutproben ausgewählt. Die Probenextraktion erfolgte mit dem MagNa Pure Extraktionsverfahren. Die in die Auswertung einfließenden Proben lagen innerhalb des kombinierten Messbereiches der Referenz-LDT und des Simplexa EBV-Assays. Die Passing-Bablok-Regression ergab eine Steigung von 0,82 und einen systematischen Fehler von 0,44.

Simplexa™ EBV Methodenvergleich
Passing-Bablok-Regression

P-B Reg.-Kurve = 0,44 + 0,82 * X
95% CI für Achsenschnittpunkt = (0,1250, 0,7401)
95% CI für Steigung = (0,7507, 0,8920)
n=56
Korrelationskoeffizient R = 0,96

Simplexa EBV-Konz.[Log10(Kopien/ml)]
3
4
5
3.5
4.0
4.5
5.0
5.5
LDT EBV-Konz.[Log10(Kopien/ml)]

Simplexa EBV-Konz.[Log10(Kopien/ml)]
P-B-Anpassung
Identitätskurve Ref=Test
95% CL



REPRODUZIERBARKEIT

Die Untersuchung zur Reproduzierbarkeit wurde auf zwei Systemen durchgeführt – mit einem Operator je System, vier Kopien jeder Panelprobe je Lauf und zwei Läufen pro Tag über fünf Tage. Die Probengruppe zur Reproduzierbarkeit umfasste eigens hergestellte Vollblutproben, denen ein EBV-Stamm in unterschiedlicher Konzentration zugesetzt worden war. Die Gruppe enthielt Kontrollen (NTC, HPC und LPC), einen negativen Pool (Vollblut ohne Zusatz), einen schwach positiven Pool (Zusatzkonzentration von etwa der zwei- bis vierfachen Nachweisgrenze (LoD, Limit of Detection)), einen mittelstark positiven Pool (etwa die 8- bis 10-fache LoD) und einen stark positiven Pool (obere Nachweisgrenze des Assays). Weiterhin umfasste die Probengruppe für jeden Quantifizierungspegel einen EBV-Quantifizierungsstandard-Satz (QS; n=5) aus einer einzigen Charge. Die Ergebnisse zur Reproduzierbarkeit jeder Panelprobe sind in der nachstehenden Tabelle aufgelistet.

Simplexa™ EBV-Reproduzierbarkeit									
					Standardabweichung				
Probenbezeichnung	**Erwartungswert Konzentration (Kopien/ml)**	**Geometrischer Mittelwert (Kopien/ml)**	**Log-Mittelwert (Kopien/ml)**	**Anzahl der messbaren Ergebnisse**	**Zwischen Geräten**	**Zwischen Tagen**	**Zwischen Läufen**	**Innerhalb eines Laufes**	**Gesamt**
NTC	0	Nicht detektiert	Nicht detektiert	0	Nicht zutreffend (n. z.)				
HPC	$2,13 \times 10^5$	$1,97 \times 10^5$	5,29	80	0,17	0,03	0,02	0,01	0,17
LPC	$4,66 \times 10^3$	$5,67 \times 10^3$	3,75	80	0,19	0,02	0,03	0,04	0,19
QS-1	$3,61 \times 10^8$	$3,66 \times 10^8$	8,56	80	0,21	0,07	0,00	0,22	0,32
QS-2	$3,91 \times 10^6$	$4,55 \times 10^6$	6,66	80	0,18	0,05	0,01	0,02	0,18
QS-3	$4,02 \times 10^4$	$5,01 \times 10^4$	4,70	80	0,21	0,03	0,01	0,02	0,21
QS-4	$4,72 \times 10^3$	$5,85 \times 10^3$	3,77	80	0,20	0,03	0,02	0,04	0,21
QS-5	$1,03 \times 10^3$	$1,42 \text{ X } 10^3$	3,15	49	0,12	0,00	0,01	0,11	0,16
Hoch konzentrierter Pool	$1,0 \times 10^7$	$1,55 \times 10^8$	8,19	67	0,25	0,13	0,13	0,05	0,31
Mittelstarker Pool	$9,0 \times 10^3$	$9,41 \times 10^3$	3,97	80	0,26	0,17	0,10	0,07	0,33
Schwach konzentrierter Pool	$3,6 \times 10^3$	$4,23 \times 10^3$	3,63	78	0,35	0,13	0,08	0,07	0,39
Neg Pool	0	Nicht detektiert	Nicht detektiert	0	n. z.				

ANALYSEEMPFINDLICHKEIT / NACHWEISGRENZE

Die Nachweisgrenze (LoD) errechnete sich aus künstlichen Proben eines EBV-Stammes mit bekannter Bestandskonzentration, der einer klinisch negativen Vollblutmatrix zugesetzt wurde. Die Probengruppe umfasste eine Negativprobe (Matrix ohne Zusatz) und seriell verdünnte Proben mit unterschiedlicher Konzentration um die ungefähre Nachweisgrenze herum. 24 Kopien aus drei (3) unterschiedlichen Extraktionen und PCR-Läufen für jeden Konzentrationsspiegel wurden mittels Probit-Analyse ausgewertet, um die geringste Konzentration zu ermitteln, die sich mit einer Wahrscheinlichkeit von 95 % noch genau detektieren ließ. Die Nachweisgrenze wurde für jedes der beiden Extraktionsverfahren ermittelt. Die einzelnen Werte für die Nachweisgrenze sind in der folgenden Tabelle aufgeführt. Basierend auf der höchsten für beide Extraktionsverfahren ermittelten Nachweisgrenze wurde für den EBV-Assay eine Nachweisgrenze von 900 Kopien/ml festgelegt.

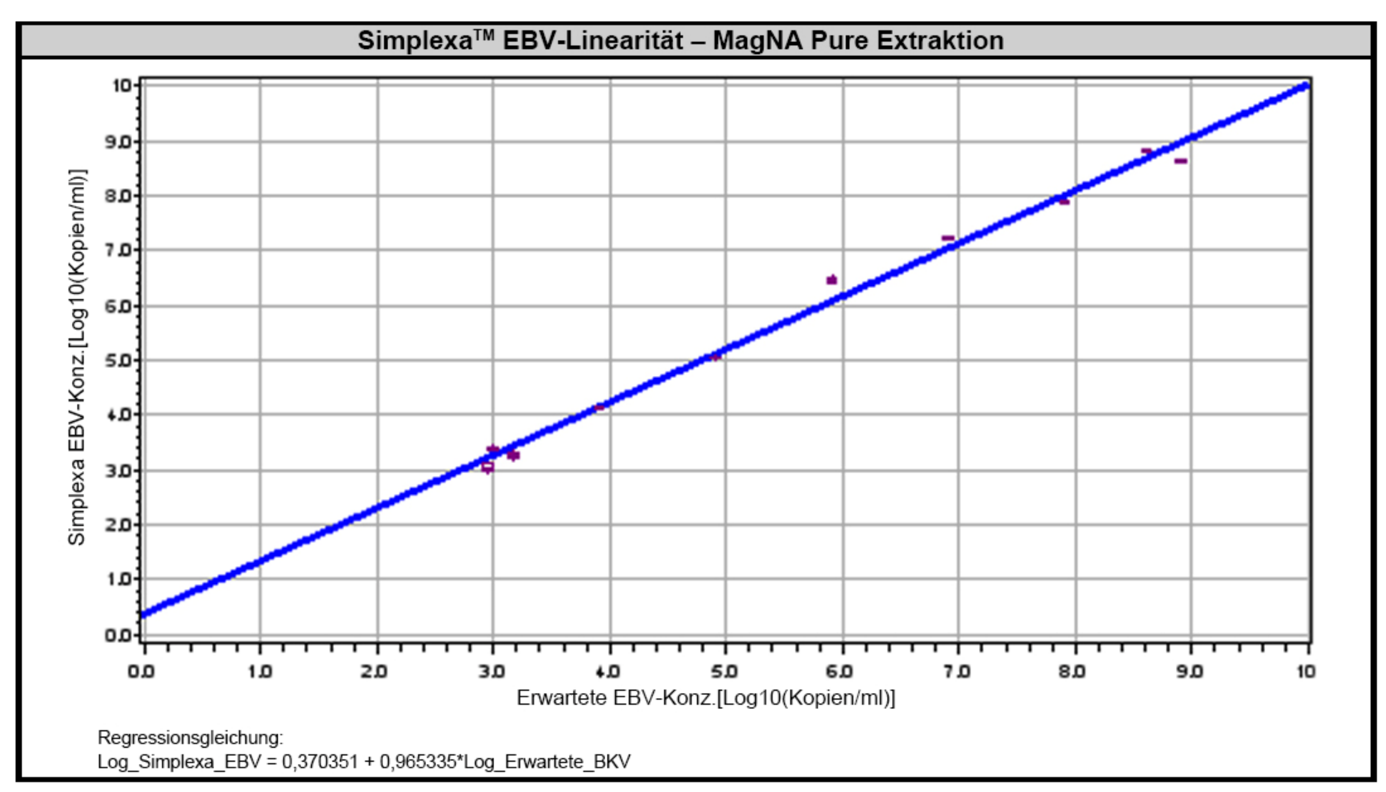
	Vollblut	
	MagNA Pure	**easyMag**
Kopien/ml	**900**	**698**

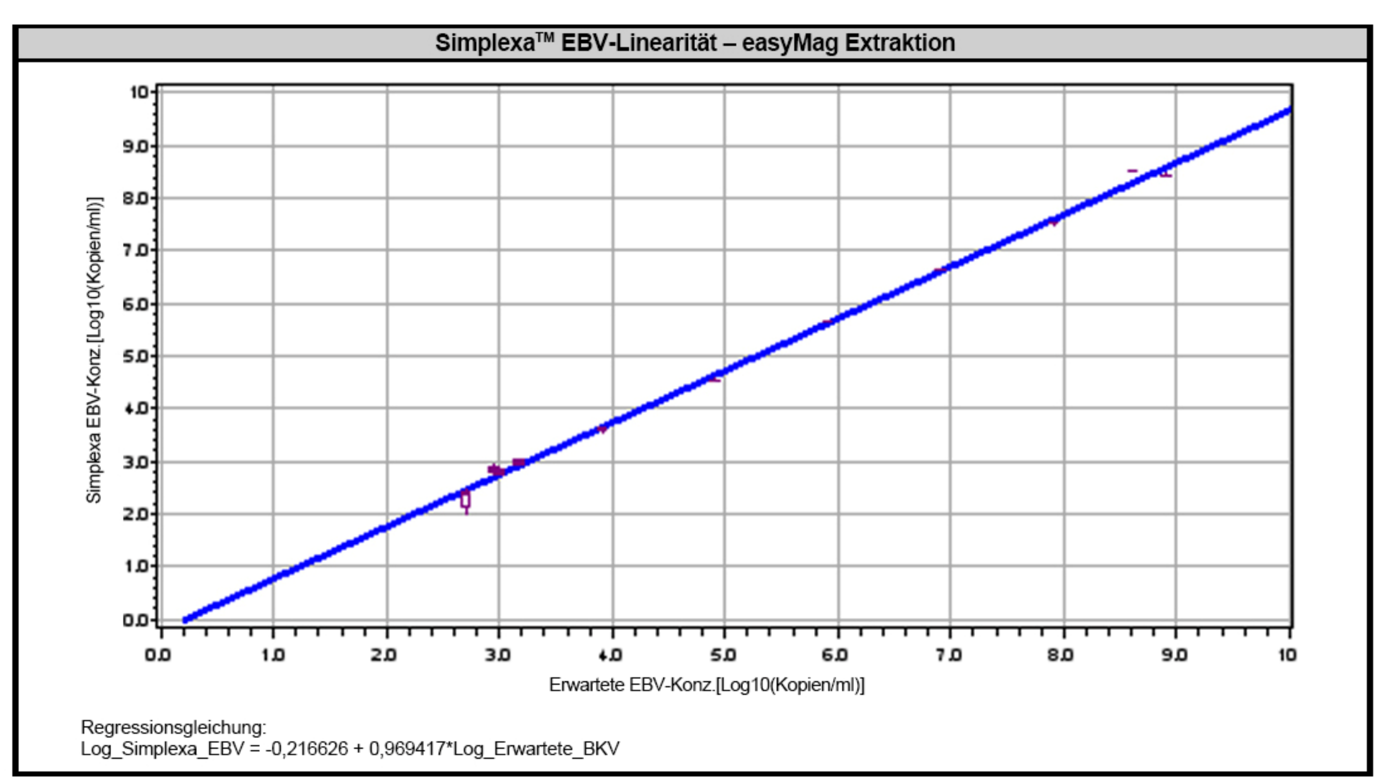
LINEARITÄT

Die Bestimmung der Linearität erfolgte unter Verwendung von Proben, für die ein EBV-Stamm mit bekannter Bestandskonzentration einer klinisch negativen Vollblutmatrix zugesetzt wurde. Die Probengruppe umfasste mindestens 10 Pools bekannter Kopienzahl, verteilt über den erwarteten linearen Bereich. Mindestens 3 Konzentrationen der Pools lagen an der Quantifizierungsuntergrenze (LLOQ), 2 lagen an der Quantifizierungsobergrenze (ULOQ) und die verbleibenden Pools verteilten sich etwa gleichmäßig zwischen der LLOQ und der ULOQ. Jede Probe wurde im Zufallsverfahren in mindestens 3 Replikaten getestet. Die Linearität wurde mit jedem der beiden Extraktionsverfahren ermittelt. Die einzelnen Werte für den Messbereich sind in der folgenden Tabelle aufgeführt.



	Vollblut	
	MagNA Pure	**easyMag**
Kopien/ml	**900** bis **8,07×10^{8}**	**900** bis **8,07×10^{8}**





MESSBEREICH

Beide Extraktionsverfahren waren bis zu einer Konzentration von 8,07 × 10^8 Kopien/ml linear. Der Messbereich des Assays wurde ausgehend von der Extraktionsmethode mit dem höchsten Wert für die Untergrenze des Linearbereichs festgelegt. Proben unterhalb des Linearbereiches werden als < 900 Kopien/ml ausgewiesen und Proben oberhalb des Linearbereiches als >8,07 x 10^8 Kopien/ml.

ANALYTISCHE REAKTIVITÄT / KREUZREAKTIVITÄT

Aus Studien ist bekannt, dass die Primer EBV-spezifisch sind und keine Kreuzreaktion mit anderen Viren und Bakterien aufweisen, u. a. mit HBV, HIV-1, HIV-2, HSV-1, HSV-2, HHV-6, HHV-7, HHV-8, HTLV-1, JCV, Parvovirus, *Toxoplasma gondii*, VZV, CMV und BKV. Weiterhin ist auch aus den Datenbanken der Nukleinsäuresequenzen ersichtlich, das die Primer EBV-spezifisch sind und keine signifikante Homologie mit anderen Erregern oder menschlicher DNA aufweisen.

INTERFERENZ

Die Leistungsfähigkeit dieses Assays bezüglich möglicherweise interferierender Substanzen wurde nicht ermittelt. Der automatisierte Nukleinsäureextraktionsprozess mit dem MagNA Pure-System oder dem NucliSENS easyMAG entfernt Verunreinigungen effektiv aus den Proben, da die Nukleinsäuren während der Extraktion isoliert und gewaschen werden. Die internen Kontrollen machen den Endnutzer auf eine mögliche Hemmung der PCR aufmerksam; wenn keines der Targets und die interne Kontrolle nicht detektiert werden, ist die Messung ungültig.

KONTAMINIERUNG DURCH VERSCHLEPPUNG

Die Amplifikation von Verschleppungen wurde mit anderen Assays für das Gerät und die Universal Disc ermittelt. Die Studien zielten darauf ab, Kontaminationen in hoch negativen Proben festzustellen. Bei jeder Studie wurde auf jeder Disc abwechselnd eine hoch positive und eine hoch negative Probe platziert. Der Verschleppungseffekt wurde durch Vergleich der gemessenen Negativrate für die hoch negative Probe mit dem Erwartungswert für Normalbedingung der Reproduzierbarkeit bestimmt. In den bisherigen Untersuchungen wurde keine Kontamination durch Verschleppung festgestellt.

LITERATUR

1. Zur Hausen H, Schulte-Holthausen H, Klein G, et al. EBV DNA in biopsies of Burkitt's tumors and anaplastic carcinomas of the nasopharynx. Nature 1970; 228:1056-8.
2. Weiss LM, Movahed LA, Warnke RA, et al. Detection of Epstein-Barr virus genomes in Reed-Sternberg cells of Hodgkin's disease. N Engl J Med 1989; 320:502-6.
3. Herbert H, Steinbecher E, Niedobitek G, et al. Distribution and phenotype of Epstein-Barr virus-harboring cells in Hodgkin's disease. Blood 1992; 80:484-91.
4. Khan G, Norton AJ, Slavin G. Epstein-Barr virus in Hodgkin's disease. Relation to age and subtype. Cancer 1993; 1:3124-9.
5. Young LS, Dawson CW, Clark D, et al. Epstein-Barr virus gene expression in nasopharyngeal carcinoma. J Gen Virol 1988; 69:1051-65.
6. Hanto DW, Frizzera G, Gajl-Peczalska KJ, et al. The Epstein-Barr virus in the pathogenesis of post-transplant lymphoma. Transplant Proc 1981; 13:756-60.
7. Hanto DW, Frizzera G, Gajl-Peczalska KJ, et al. Epstein-Barr virus induced B-cell lymphoma after renal transplantation. Acyclovir therapy and transition from polyclonal to monoclonal B-cell proliferation. N Engl J Med 1982; 306:913-8.
8. Borisch B, Gatter KC, Tobler A, et al. Epstein-Barr virus-associated anaplastic large cell lymphoma in renal transplant recipients. Am J Clin Pathol 1992; 98:312-8.
9. Cinque P, Brytting M, Vago L, et al. Epstein-Barr virus DNA in cerebrospinal fluid from patients with AIDS-related primary lymphoma of the central nervous system. Lancet 1993; 342:398-401.
10. Arribas JR, Clifford DB, Fichtenbaum CJ, et al. Detection of Epstein-Barr virus DNA in cerebrospinal fluid for diagnosis of AIDS-related central nervous system lymphoma. J Clin Microbiol 1995; 33:1580-1583.
11. Gaillard F, Mechinaud-Lacroix F, Papin S, et al. Primary Epstein-Barr virus infection with clonal T-cell lymphoproliferation. Am J Clin Pathol 1992; 98:324-33.
12. Jones JF, Shurin S, Abramowsky C, et al. T cell lymphomas containing Epstein-Barr viral DNA in patients with chronic Epstein-Barr virus infections. N Engl J Med 1988; 318:733-41.
13. Telenti A. Epstein-Barr virus and lymphoproliferative disorders: basic concepts and diagnostic approach. Clin. Immunol. Newsl. 1991; 11:81-88.
14. Au W-Y et al, Quantification of circulating Epstein-Barr virus (EBV) DNA in the diagnosis and monitoring of natural killer cell and EBV-positive lymphomas in immunocompetent patients. Blood, 1 July 2004 _ Volume 104, Number 1; 243-249
15. Cornelissen J, Molecular monitoring of EBV-positive lymphoma. Blood, 1 July 2004 _ Volume 104, Number 1; 9
16. NCCLS H18-A2. Procedures for the Handling and Processing of Blood Specimens; Approved Guideline. 2nd Ed. (1999).
17. CDC-NIH Manual. (1999) Biosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories. 4th ed. And National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS). Protection of Laboratory Workers from Instruments, Biohazards and Infectious Disease Transmitted by Blood, Body Fluids and Tissue (NCCLS M29-A).

VERTRIEB DURCH:
mdi Europa GmbH, Langenhagener Str. 71 30855, Langenhagen-Hannover, Deutschland

BESTELLINFORMATIONEN

Telefon:	**(800) 838-4548 (nur USA)**	**(562) 240-6500 (International)**
Fax:	**(562) 240-6510**	

TECHNISCHE HILFE

Telefon:	(800) 838-4548 (nur USA)	(562) 240-6500 (International)
Fax:	(562) 240-6526	

Besuchen Sie unsere Webseite: www.focusdx.com

PI.MOL2400.OUS.DE
Rev. F
rstellungsdatum: 13.Dezember-2012



Cypress, Kalifornien 90630 USA